



|              |                                                                               |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | ヒトiPS細胞集塊の大量培養システム設計に関する研究                                                    |
| Author(s)    | 都倉, 知浩                                                                        |
| Citation     | 大阪大学, 2026, 博士論文                                                              |
| Version Type | VoR                                                                           |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.18910/105409">https://doi.org/10.18910/105409</a> |
| rights       |                                                                               |
| Note         |                                                                               |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 都 倉 知 浩 )

論文題名 ヒトiPS細胞集塊の大量培養システム設計に関する研究

## 論文内容の要旨

再生医療・細胞治療の産業化には、同種移植用の細胞を大量に製造する技術が不可欠である。しかし、従来の物質生産を目的とした培養プロセス設計は、細胞自体が製品であり、接着依存性や機械的脆弱性をもつiPS細胞の大量培養には適用が困難である。iPS細胞の大量培養は三次元集塊培養が必須であり、そのプロセスは集塊形成、細胞増幅、培地交換など複数の工程からなる複合システムである。本研究では、細胞製造性の概念に基づき培養プロセスを設計した。生物学的要求事項の体系化、工程間の統合、スケールアップの構築を通じ、再現性の高い大量培養システムの設計手法を確立することを目的とした。

第1章では、スケールアップに向けた集塊培養システム設計を行った。細胞自体が最終製品である細胞製造において、細胞の遺伝子改変や下流工程の技術的制限が培養システム設計における制約となる。本研究では、物質生産プロセスで用いられてきた工学的アプローチとは異なる細胞製造性に基づく設計手順を構築し、生物学的特性の体系化と機能の最小単位に分離された単位工程の設計を提案した。生物学的特性については、細胞の挙動を細胞レベルと集塊レベルの2段階で体系的に整理し、それぞれの挙動と環境特性を制御する工学的特性との関連を明らかにした。さらに、これらの整理から集塊培養システムを集塊形成工程、培地交換工程、細胞増幅工程の3つの単位工程に機能分離する戦略を採用した。これらの生物学的要求事項と工学的制約を関連付けた設計フレームワークを提示し、後続の章で検証する設計論を確立した。

第2章では、第1章の設計に基づき、各単位工程の小規模での設計と妥当性検証を行った。集塊形成工程においては、攪拌方法の選択により初期集塊の形成に及ぼす影響を評価した。振とう攪拌では単細胞に分離された細胞や過度に凝集した細胞集塊が発生した一方で、デルタ翼型攪拌装置は穏やかな流動により均一な初期集塊を形成した。培地交換工程では、タンジェンシャルシャルフローろ過（TFF）システムにおいて集塊を分離精製するための操作条件を検討した。膜詰まりと膜面の閉塞という2種の閉塞を抑制することで高い回収率を達成した。細胞増幅工程では、攪拌による流体力学的応力による細胞集塊への影響を最小化するため、塑性流体による無攪拌での浮遊培養と、酸素供給のための間欠攪拌を組み合わせた培養システムを設計し、1 L規模で従来法と同等の増殖効率を示す集塊培養システムを実証した。

第3章では、第2章で確立した単位工程を統合し、10 L規模のスケールアップ実証を行った。集塊形成工程は攪拌翼の翼端速度をスケールアップ指標にすることで100 mLから5 Lへのスケールアップに成功した。培地交換工程においては、処理量増大に伴う膜面の詰まりを抑制するために逆洗浄操作を導入した。細胞増幅工程においては、1 L規模で成功した塑性流体を用いた間欠攪拌システムを従来のフルード数に基づきスケールアップした結果、集塊が崩壊し細胞数が減少した。この課題に対して生物学的アプローチとして集塊の物理的堅牢性を高めるRho-associated protein kinase (ROCK) 阻害剤を継続添加することで未分化性を維持したまま  $(1.09 \pm 0.02) \times 10^{10}$  cellsの大量培養を達成した。

本研究は、再生医療の産業化に不可欠なヒトiPS細胞の大量培養に対し、従来の物質生産における培養プロセスとは異なる設計思想を示し、細胞製造性の概念に基づく体系的設計手法の有効性を実証した。本研究を通じて得られた最も重要な知見は、10 L規模へのスケールアップ時に、従来の工学的指針（フルード数）ではスケールアップが破綻するという点である。これは、従来の単一細胞で重要視されたせん断応力に加え、垂直応力が集塊の構造維持において重要であることを示唆している。さらに、この工学的な応力環境が集塊の生物学的な構造強度を上回るという課題に対し、ROCK阻害剤の添加により集塊の堅牢性を高める生物学的アプローチが有効であることを明らかにした。この知見は、今後の大量培養システムの設計が、工学的応力と生物学的堅牢性の定量的関係性の解明に基づいて行われるべきであることを示している。本研究で確立した設計論は、臨床応用可能な細胞数を安定製造するための基盤技術として寄与すると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

|                 |     |     |        |
|-----------------|-----|-----|--------|
| 氏 名 ( 都 倉 知 浩 ) |     |     |        |
|                 | (職) | 氏 名 |        |
| 論文審査担当者         | 主 査 | 教授  | 紀ノ岡 正博 |
|                 | 副 査 | 教授  | 清水 浩   |
|                 | 副 査 | 教授  | 大政 健史  |

**論文審査の結果の要旨**

本論文は、再生医療に用いられる細胞製品の原料である人工多能性幹細胞（iPS）を対象に、集塊上での大量培養を目指し、細胞製造性の概念に基づき培養プロセスを設計している。その際、生物学的要求事項の体系化、工程間の統合、スケールアップの構築を通じ、再現性の高い大量培養システムの設計手法を確立し、大量培養を実現している。

第 1 章では、スケールアップに向けた集塊培養システム設計を行っている。物質生産プロセスで用いられてきた工学的アプローチとは異なる細胞製造性に基づく設計手順を構築し、生物学的特性の体系化と機能の最小単位に分離された単位工程の設計を提案している。生物学的特性については、細胞の挙動を細胞レベルと集塊レベルの 2 段階で体系的に整理し、それぞれの挙動と環境特性を制御する工学的特性との関連を明らかにしている。さらに、これらの整理から集塊培養システムを集塊形成工程、培地交換工程、細胞増幅工程の 3 つの単位工程に機能分離する戦略を採用することで、これらの生物学的要求事項と工学的制約を関連付けた設計フレームワークを提示し、後続の章で検証する設計論を確立している。

第 2 章では、第 1 章の設計に基づき、各単位工程の小規模での設計と妥当性検証を行っている。集塊形成工程においては、攪拌方法の選択により初期集塊の形成に及ぼす影響を評価している。振とう攪拌では単細胞に分離された細胞や過度に凝集した細胞集塊が発生した一方で、デルタ翼型攪拌装置は穏やかな流動により均一な初期集塊を形成することを示している。培地交換工程では、タンジェンシャルシャルフローろ過（TFF）システムにおいて集塊を分離精製するための操作条件を検討している。膜詰まりと膜面の閉塞という 2 種の閉塞を抑制することで高い回収率を達成している。細胞増幅工程では、攪拌による流体力学的応力による細胞集塊への影響を最小化するため、塑性流体による無攪拌での浮遊培養と、酸素供給のための間欠攪拌を組み合わせた培養システムを設計し、1 L 規模で従来法と同等の増殖効率を示す集塊培養システムを実証している。

第 3 章では、第 2 章で確立した単位工程を統合し、10 L 規模のスケールアップ実証を行っている。集塊形成工程は攪拌翼の翼端速度をスケールアップ指標にすることで 100 mL から 5 L へのスケールアップに成功している。培地交換工程においては、処理量増大に伴う膜面の詰まりを抑制するために逆洗浄操作を導入している。細胞増幅工程においては、1 L 規模で成功した塑性流体を用いた間欠攪拌システムを従来のフルード数に基づきスケールアップしつつ生物学的アプローチとして集塊の物理的堅牢性を高める Rho-associated protein kinase（ROCK）阻害剤を継続添加することで未分化性を維持したまま（ $1.09 \pm 0.02$ ） $\times 10^{10}$  cells の大量培養を達成している。

以上のように、本論文は、再生医療の産業化に不可欠なヒト iPS 細胞の大量培養に対し、従来の物質生産における培養プロセスとは異なる設計思想を示し、細胞製造性の概念に基づく体系的設計手法の有効性を実証している。特に、大量培養システムの設計が、工学的応力と生物学的堅牢性の定量的関係性の解明に基づいて行われるべきであることを

提唱し、確立した設計論は、臨床応用可能な細胞数を安定製造するための基盤技術設計の点で学術的に高い価値を有するものである。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。